

Extended Resolution in Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

Doctoral Thesis

Author(s):

Beck, Markus

Publication date:

2008

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005680673>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 17974

Extended Resolution in Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

MARKUS BECK

Diploma in Physics, University of Tübingen

born July 15, 1976

citizen of Germany

Accepted on the recommendation of:

Prof. Andreas Stemmer, examiner

Prof. Ivo F. Sbalzarini, co-examiner

Zurich, 2008

Abstract

Optical microscopy provides indispensable tools for non-invasive studies in cell biology, among which fluorescence microscopy is probably the most powerful tool allowing identification of molecules and molecular assemblies by highly specific labeling. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy had a huge impact in biological science affording a large variety of new experiments to study cells and cellular components. Illumination of the specimen with an evanescent wave decaying exponentially in axial direction results in an essentially two-dimensional image. Thus, processes related to the plasma membrane, such as endocytosis, exocytosis and cell adhesion can be visualized without disturbing interference from regions deeper within the sample. TIRF microscopy further increases the throughput in microarray analysis and provides a means for single molecule imaging. However, for proper analysis many structures and processes require lateral resolution better than 100 nm. To this end, the resolution of TIRF microscopy needs to be extended beyond the classical diffraction limit.

In recent years, new concepts were developed to overcome the resolution limit in fluorescence microscopy. Among the established approaches, harmonic excitation light microscopy (HELM) has already proven a resolution enhancement by a factor of two in standard epi-fluorescence. Thereto, HELM uses a mesh-like excitation grid of interfering laser beams to encode classically non-detectable higher spatial frequencies into the fluorescence signal. The additional information can be extracted by detection of the signal variations when the pattern is shifted over the sample. A two-dimensional resolution increase requires a set of five images to reconstruct the extended image spectrum. The combination of TIRF microscopy and HELM affords evanescent wave imaging with sub-100 nanometer lateral resolution.

We present a novel objective-launch setup for standing wave illumination that takes advantage of a tunable transmission diffraction grating and transparent phase shifters actuated by electro-active polymers (EAP) to control the excitation

pattern in three dimensions. The polymeric grating allows one to vary the spatial period and penetration depth of the excitation light, and two phase retarders shift the illumination pattern in the object plane. For image reconstruction we employ correlation analysis to detect the initial phase of the illumination pattern and a new apodization function whose profile accounts for the high-resolution and the form of the extended passband. As a result the lateral resolution for green emission wavelength amounts to 89 nm. Our scheme is applicable to biological single- and multi-color formats employing protein and quantum dot labeling.

A general constraint in fluorescence microscopy is the notoriously weak light emission of labeled cells leading to long integration times and low signal-to-noise ratios (SNRs). Generally, noise in the raw data hampers image reconstruction and leads to severe artifacts in the final image. Simulations and experiments show that noise compensation in terms of Wiener filtering and by appropriate dimensions of the apodization function is limited to images with fairly high SNR. For data with stronger noise corruption new filter methods have to be applied. Wavelet-based denoising schemes are powerful tools for noise suppression at high data fidelity. We found the *à trous* denoising algorithm to perform best, as it conserves high-frequency information of the raw data. Applied to biological images such processing can increase the SNR of the raw data by 16 dB, resulting in high resolution images with significantly enhanced quality.

Zusammenfassung

Lichtmikroskopie bietet unerlässliche Werkzeuge in der Zellbiologie um nicht-invasive Studien zu erstellen, unter welchen die Fluoreszenzmikroskopie wohl die wichtigste Entwicklung im letzten Jahrhundert darstellt. Hochspezifische Marker erlauben die Identifikation von Molekülen und Molekülverbänden. Fluorophoranregung mit unterschiedlichen Wellenlängen ermöglicht darüberhinaus die unabhängige Visualisierung von multiplen Markern und gewährt somit Einsicht in die komplexen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen molekularen Bestandteilen.

TIRF-Mikroskopie (*Total internal reflection fluorescence microscopy*) hatte grosse Wirkung auf das Feld der Biologie wo sie eine Vielzahl neuer Experimente an Zellen ermöglichte. Die Probenanregung mit einer evaneszenten Welle, die in axialer Richtung exponentiell abklingt, ergibt im Wesentlichen ein zweidimensionales Bild ohne störenden Interferenzen aus tiefergelegenen Regionen der Probe. Folglich können Prozesse der Plasmamembrane, wie die Endozytose, die Exozytose und die Zelladhäsion visualisiert werden. Darüberhinaus gibt es bei dieser Technik eine starke Felderhöhung wenn Totalreflektion eingestellt wird, welche benutzt werden kann, um einzelne Moleküle abzubilden. Andere Anwendungen finden sich in der Mikroarrayanalyse. Dort folgt durch das Auslesen der Fluoreszenz, mit einer stark begrenzten Oberflächenanregung, eine hohe Empfindlichkeit und ein stark reduzierter Hintergrund, der von Arraysubstrat und ungewaschenen Reagenten herrührt. Dadurch wird ein höherer Durchlauf auf Seiten der Detektierung und der Präparation ermöglicht. Die sorgfältige Analyse vieler Strukturen und Prozesse benötigt jedoch eine laterale Auflösung von mehr als 100 nm. Um dies zu erreichen muss die Auflösung in TIRF-Mikroskopie über die klassische Grenze hinaus erweitert werden. In den letzten Jahren wurden neue Konzepte zur Überwindung der Auflösungsgrenze entwickelt. Unter den etablierten Ansätzen, hat *harmonic excitation light microscopy* (HELM) schon bewiesen, dass sie die Auflösung von Fluoreszenzmikroskopie um einen Faktor von zwei erhöht. HELM benutzt dazu ein Anregungsgitter, geformt

von interferierenden Laserstrahlen, um die Fluorophore zu untersuchen. Die Variationen der Fluoreszenz, wenn das Muster über die Probe verschoben wird, enthält klassisch nicht detektierbare Informationen. Die höheren Frequenzen werden aus einem Satz, bestehend aus fünf Bildern, extrahiert und zu einem erweiterten Spektrum zusammengefügt.

Die *wide-field* Technik ist besonders geeignet um mit TIRF-Mikroskopie kombiniert zu werden, da die Periode der stehenden Welle, im Material des Probenhalters mit hoher Brechzahl, weiter reduziert werden kann. Anwendbar auf alle gewöhnlichen Fluorophore ermöglicht diese Methode optische Bildgebung durch eine evaneszenten Welle mit lateraler Auflösung von unter 100 Nanometern.

Wir präsentieren einen neuartigen, objektseitig betriebenen Aufbau, zur Beleuchtung mit einer Stehwelle, der sich die Vorteile eines einstellbaren Beugungsgitters und transparenten Phasenschiebern zunutzen macht. Der Betrieb dieser Elemente durch elektroaktive Polymere (EAPs) dient zur Kontrolle des Anregungsmusters in drei Dimensionen. Das verstellbare Gitter erlaubt es die räumliche Periode sowie der Eindringtiefe des Anregungslichtes in der Objektebene zu variieren, und die beiden Phasenschieber dienen dazu das Beleuchtungsmuster lateral zu verschieben. Für die Rekonstruktion des erweiterten Bildspektrums detektieren wir die Anfangsphase des Beleuchtungsmusters durch Kreuzkorrelationsanalyse und wir verwenden eine neue Apodisierungsfunktion die dem Spektrum von HELM angepasst ist. Als Resultat ergibt sich eine Auflösung von 89 nm bei grüner Emissionswellenlänge. Unser Schema ist auf biologische Proben anwendbar, in ein- oder mehrfarbigen Formaten unter Verwendung von Proteinen und *Quantum dots*.

Im zweiten Teil widmen wir uns einer allgemeinen Beschränkung in der Fluoreszenzmikroskopie: Die notorisch schwache Lichtemission von gelabelten Zellen, welches zu langen Belichtungszeiten und niedrigem Signal-zu-Rauschverhältnis (SNR) führt. Verrauschte Rohdaten erschweren die Bildrekonstruktion und führen zu ernsthaften Artefakten im finalen Bild. Simulationen und Experimente zeigen, dass Rauschkompensierung mit Hilfe von Wienerfiltern und durch angebrachte Dimensionierung der Apodisierungsfunktion nur bedingt, für Bilder mit genügend hohem SNR, geeignet ist. Für stark verrauschte Daten müssen neue Methoden angewandt werden. Wavelet basierte Filterschemata sind mächtige Werkzeug zu Rauschunterdrückung bei gleichzeitig hoher Datentreue. Wir fanden heraus, dass der *à trous* Algorithmus am besten bei der Rauschunterdrückung abschneidet, da er die hochfrequenten Informationen der Rohdaten konserviert. Ange-

wandt auf biologische Bilder kann solch eine Bearbeitung das SNR um 16 dB erhöhen, was in hochaufgelösten Bildern mit bezeichender Bildqualität resultiert.